

## 明細書

## 高度安全性痘瘡ワクチンウイルスおよびワクシニアウイルスベクター

## 技術分野

本発明は、新規なワクシニアウイルスおよびウイルスベクターに関するものである。具体的には、リバージョン（復帰突然変異または先祖帰り）を起こしやすい弱毒痘瘡ワクシニアウイルスLC16m8株およびその親株LC16m0株から、リバージョンに関わる遺伝子を除去することによりリバージョンを起こしにくくした、遺伝的に安定でより安全なワクシニアウイルスおよびワクシニアウイルスベクターに関するものである。

## 背景技術

痘瘡ワクチンはかつて全世界で使用され、天然痘の撲滅に貢献した。しかし、当時のワクチン株はいずれも、1) 種痘後脳炎のような重篤な副作用を引き起こすこと、2) ワクチンの生産はウイルスを牛の皮膚に接種し、できた膿瘍から取り出すという原始的な手法によっており、無菌性を保証することが容易ではない、という問題点を持っていた。千葉県血清研究所の橋爪らはこのような問題点を解決するために、当時世界中で用いられていた痘苗株の中で比較的副作用が少ないとされていたLister株を初代ウサギ腎臓細胞（PRK）に30℃で継代培養し、その中から、40.8℃以上では増殖しない温度感受性株としてLC16株を樹立した。LC16株はサルの中樞神経系に対する病原性が、親株のLister株や当時ワクチンに使用されていた他の株に比べ大きく減弱していたが、ウサギの皮膚での増殖性はむしろ亢進していることが判明した。そこでさらにPRKでの継代を重ね、より小さなポックを形成するLC16m0株（以下m0株と称することもある）を選択した。m0株は約1000人に接種された。しかしm0株でも皮膚での反応がまだ強かったために、m0株からさらに

ポックサイズが小さい株として LC16m8 株（以下 m8 株と称することもある）が樹立された（橋爪 壮、臨床とウイルス Vo. 3 No. 3 昭和 50 年 7 月 1 日）。m8 株は、1974 年から 1975 年にかけて 10 万人の子供に接種されたが、重篤な副反応は報告されなかったことから、従来のワクチン株に比較して高い安全性が証明され、正式なワクチン株として厚生省から認可された。m0 株と比較すると、m8 株は皮膚増殖能が弱いにもかかわらず抗体誘導能は親株の Lister 株とほぼ同程度であり、また安全性では明らかに優れていた。この株はウサギ腎臓の初代培養細胞を用いた無菌的な組織培養によって製造できる点も大きな改善点であった。しかし、m8 株を用いた応用研究と平成 13 年度の千葉県血清研究所における実製造の経験から、m8 株の培養過程でラージプラークを形成するリバータント（復帰突然変異体）が出現することが明らかになった。リバータントはプラーク純化した m8 からも出現することから、リバータントウイルスの出現は m8 株の避けがたい性質であり、リバータントの性状は m0 株に酷似し、皮膚での増殖能が昂進していることから、リバータントの混入はワクチンの安全性に懸念を生じかねないことが判明した。

また、ワクシニアウイルスは、広い宿主域と高い発現効率を有しているという理由で、他の外来遺伝子を導入し、ベクターとして用いられていた（特表平11-509091）。前述の LC16m0 株や LC16m8 株もその高い安全性から、ベクターとしての使用について検討されていた。

しかし、上述のように LC16m0 株は皮膚増殖性の面で問題があり、LC16m8 株はリバータントの出現という問題があったので、痘瘡ワクチン株あるいはベクターウイルスとしてより安全性の高いウイルス株を作出する必要性があった。

## 発明の開示

本発明は、リバージョン（先祖帰り）を起こしにくいワクチン株を作出し、より安全性の高い痘瘡ワクチンを提供することを目的とする。更

にそのウイルスを利用して外来遺伝子を安全に発現するためのベクターウイルスを提供することを目的とする。

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究の結果、リバージョンに関わる遺伝子がウイルスの宿主城やプラークサイズに関わる B5R 遺伝子であることを突き止めた。つまり、m8 株では B5R 遺伝子が orf 内での 1 塩基欠失によるフレームシフトで orf の大部分が失われることにより失活しているが、リバータントでは新たに別の箇所に塩基の挿入が起こることによって orf が復元されていることを明らかにした（図 1 および 2）。RV の B5R 遺伝子の塩基配列を配列番号 1 に、B5R 遺伝子産物のアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。m0 株では B5R 遺伝子の orf は完全である。そこで、まず m0 株の B5R 遺伝子をクローニングし、m8 株に相同組換えによって導入し、完全な B5R 遺伝子を持つ組換えウイルス（RVV）を作製した（m8B5R）。この RVV のスクリーニングはラージプラークを選択し、さらに B5R 遺伝子をシーケンスすることによって行った。次に、プロモーター領域を含む B5R 遺伝子全体を完全に欠失させたコンストラクトとを作製し（ $\Delta$ B5R、図 6）、相同組換えによって m8B5R と m0 株に B5R 遺伝子の欠失を導入した RVV（それぞれ m8 $\Delta$ B5R（以下 m8 $\Delta$  と称することもある）、m0 $\Delta$ B5R（以下 m0 $\Delta$  と称することもある））を作出した。さらに、B5R 遺伝子の膜貫通領域を取り除き、高発現プロモーター PSFJ 1-10 につないだコンストラクトを作成し（proB5RdTM、図 6）、同様に m8B5R と m0 株に導入した（それぞれ m8proB5RdTM（以下 m8dTM と称することもある）、m0proB5RdTM（以下 m0dTM と称することもある））を作出した。RVV のスクリーニングは小さなプラークを選択し、さらにゲノムのシーケンスを確認することによった。

B5R 遺伝子の欠失を導入した 2 種類の RVV（m8 $\Delta$ B5R、m0 $\Delta$ B5R）と、B5R 遺伝子の機能を欠失させて高発現させた 2 種類の RVV（m8proB5RdTM、m0proB5RdTM）の遺伝的安定性を m8 株と比較するため、製造と同じ培養温度（30℃）及び 34℃でこれらのウイルスを初代ウサギ腎細胞に 7 代継

代し、更にリバタントを選択的に増幅して検出を容易にするため Vero 細胞に 34℃で 2 代継代してラージプラークの比率を測定した。対照として再クローニングした m8 株 (m8rc) を用いた (図 8)。その結果、m8rc では 30℃継代で 8.7%、34℃継代では 60.3% のウイルスがラージプラークを形成したのに対し、これら 4 種類の RVV ではいずれの温度においてもラージプラークが検出されなかった。m8rc から出現したラージプラークを形成するクローンの B5R 遺伝子を調べたところ全てで挿入変異による orf の回復が認められた。

以上の結果から、m8ΔB5R、m0ΔB5R、m8proB5RdTM および m0proB5RdTM は m8 株に比べ遺伝的な安定性が高いことが証明された。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] ワクシニアウイルス株 LC16 株、LC16m8 株または LC16m0 株の B5R 遺伝子の一部または全部が欠失しており、正常な機能を有する B5R 遺伝子産物を産生しないワクシニアウイルスからなる痘瘡ワクチンであって、正常な機能を有する B5R 遺伝子産物の産生を引き起こす復帰突然変異を起こしにくい痘瘡ワクチンウイルス、

[2] B5R 遺伝子を完全に欠失している、[1] の痘瘡ワクチンウイルス、

[3] B5R 遺伝子の一部が欠失し、正常な機能を有する B5R 遺伝子発現産物が産生されない、[1] または [2] の痘瘡ワクチンウイルス、

[4] RK13 細胞に感染させたときのプラークサイズおよびウサギに投与したときの皮下増殖性が LC16m8 株と同等である [1] から [3] のいずれかの痘瘡ワクチンウイルス、

[5] B5R 遺伝子の一部が欠失し、該 B5R 遺伝子の上流にプロモーターを連結させ、B5R 遺伝子の一部が発現するが、該発現産物は B5R 遺伝子発現産物の正常な機能を失っている、[1] から [4] のいずれかの痘瘡ワクチンウイルス、

[6] B5R 遺伝子の膜貫通ドメインが欠失している、[3] から [5] のいずれかの痘瘡ワクチンウイルス、

[7] プロモーターがPSFJ1-10、PSFJ2-16または他のボックスウイルス用高発現プロモーターである、[5]または[6]の痘瘡ワクチンウイルス

[8] B5R遺伝子のうち膜貫通ドメインの全部または一部が欠失しているワクシニアウイルスよりなる痘瘡ワクチンウイルス、

[9] B5R 遺伝子の上流にプロモーターが連結し、B5R 遺伝子の一部が発現するが、該発現産物は B5R 遺伝子発現産物の正常な機能を失っている、[8]の痘瘡ワクチンウイルス、

[10] プロモーターが PSFJ1-10、PSFJ2-16 または他のボックスウイルス用高発現プロモーターである、[8]または[9]の痘瘡ワクチンウイルス、

[11] [1]から[10]のいずれかの痘瘡ワクチンウイルスを含む痘瘡ワクチン医薬組成物、

[12] ワクシニアウイルス株LC16株、LC16m8株またはLC16m0株のB5R遺伝子の一部または全部が欠失しており、正常な機能を有するB5R遺伝子産物を産生しないワクシニアウイルスベクターであって、正常な機能を有するB5R遺伝子産物の産生を引き起こす復帰突然変異を起こしにくいワクシニアウイルスベクター、

[13] B5R遺伝子を完全に欠失している、[12]のワクシニアウイルスベクター、

[14] B5R遺伝子の一部が欠失し、正常な機能を有するB5R遺伝子発現産物が産生されない、[12]または[13]に記載のワクシニアウイルスベクター、

[15] ウサギ腎臓細胞に感染させたときのプラークサイズおよびウサギに投与したときの皮下増殖性がLC16m8株と同等である[12]から[14]のいずれかのワクシニアウイルスベクター、

[16] B5R遺伝子の一部が欠失し、該B5R遺伝子の上流にプロモーターを連結させ、B5R遺伝子の一部が発現するが、該発現産物はB5R遺伝子発

現産物の正常な機能を失っている、[1 2]から[1 5]のいずれかのワクシニアウイルスベクター、

[1 7] B5R遺伝子の膜貫通ドメインが欠失している、[1 2]から[1 6]のいずれかのワクシニアウイルスベクター、

[1 8] プロモーターがPSFJ1-10、PSFJ2-16または他のボックスウイルス用高発現プロモーターである、[1 6]または[1 7]のワクシニアウイルスベクター、

[1 9] B5R遺伝子のうち膜貫通ドメインの全部または一部が欠失しているワクシニアウイルスベクター、

[2 0] B5R 遺伝子上流にプロモーターが連結し、B5R 遺伝子の一部が発現するが、該発現産物は B5R 遺伝子発現産物の正常な機能を失っている、[1 9]のワクシニアウイルスベクター、

[2 1] プロモーターがPSFJ1-10、PSFJ2-16または他のボックスウイルス用高発現プロモーターである、[1 9]または[2 0]のワクシニアウイルスベクター、

[2 2] 外来遺伝子を含む[1 2]から[2 1]のいずれかのワクシニアウイルスベクター、

[2 3] 外来遺伝子がウイルス、細菌、原虫または癌の抗原である[2 2]のワクシニアウイルスベクター、ならびに

[2 4] [2 3]のワクシニアウイルスベクターを含む、ウイルス、細菌、原虫または癌用ワクチンウイルス医薬組成物。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、LC16m0株、LC16m8株およびLC16m8株のリバータントのB5R遺伝子の塩基配列を示す図である。

図 2 は、LC16m0株、LC16m8株およびLC16m8株のリバータントのB5R遺伝子産物のアミノ酸配列を示す図である。

図 3 は、Lister株からLC16m8への継代を示す図である。

図 4 は、Lister 株、LC16m0 株および LC16m8 株の特徴を示す図である。

図 5 は、LC16m8 株、LC16m8 株のリバートントである LPC (Large Plaque Clone) および LC16m0 株のプラークサイズを示す図である。

図 6 は、B5R 遺伝子を欠失したウイルスの構築方法の概念図である。

図 7 は、改良型ウイルスを感染させた RK13 細胞画分の B5R タンパク質発現をウエスタンブロットで確認した結果を示す写真である。

図 8 は、改良型ウイルスの細胞継代培養によるリバートントの出現頻度を示す図である。

図 9 は、改良型ウイルスのウサギにおける皮膚増殖性を示す図である。

図 10A は、ウイルスを投与した SCID マウスの体重減少を示す図である。

図 10B は、ウイルスを投与した SCID マウスの体重減少を示す図である。

図 11 は、ウイルスを投与した SCID マウスにおける RED50 の経時的変化を示す図である。

図 12 は、強毒ワクシニアウイルスで攻撃した BALB/c マウスの体重減少を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明のワクシニアウイルスは、ワクシニアウイルス、例えば、LC16 株、LC16m0 株または LC16m8 株の B5R 遺伝子の総てまたは一部を欠失させることにより作出することができる。B5R 遺伝子は、エンベロープに存在するタンパク質をコードしており、B5R 遺伝子産物は、ウイルスの感染に関与している。B5R 遺伝子が存在すると、皮膚増殖性が大きく、ヒトに投与した場合、自己接種等の副作用を引き起こすという問題があった。LC16m8 株は、B5R 遺伝子中の一塩基のフレームシフト変異により、B5R 遺伝子産物が産生されず、皮膚増殖性は弱くなっていたが、復帰突然変異により正常な機能を有する B5R 遺伝子産物が産生されるようになり (リバージョン)、病原性が復活するおそれがあった。

本発明のワクシニアウイルスでは、B5R 遺伝子の総てまたは一部が欠

失しているため、m0ΔB5R 株においては、親株の LC16m0 株の 元来有していた病原性が低下し、m8ΔB5R においては、親株の LC16m8 株の復帰突然変異によりリバータントが生じることがない。

本発明における B5R 遺伝子の欠失は、B5R 遺伝子が発現しないかあるいは発現してもその発現タンパク質が B5R 遺伝子産物の正常な機能を保持していないような欠失である。本欠失は、ウイルスの点突然変異により形質が復帰するようなものではなく、一旦失われた B5R 遺伝子産物の正常な機能が復帰することのない欠失である。例えば、LC16m8 株は、突然変異により B5R 遺伝子の塩基の一つが欠失しフレームシフトを起こし、B5R 遺伝子の ORF がずれ、正常な B5R が発現しなくなっている。しかし、一塩基欠失部分の近傍の点突然変異により塩基一つが挿入されることにより B5R 遺伝子の ORF が元に戻り、正常な機能を有する B5R が発現するようになり、先祖帰りを起こす。本発明の欠失はこのような点突然変異により先祖帰りを起こしうる欠失を含まない。B5R 遺伝子は、SCR1 から SCR4 までの短コンセンサス領域 (Short consensus region) および膜貫通ドメイン (TM:Transmembrane Domain) からなり、膜貫通ドメインが B5R 遺伝子産物の機能に重要な働きをする。従って、B5R 遺伝子の欠失は、膜貫通ドメインの欠失でもよい。また、膜貫通ドメインだけではなく、SCR1 から SCR4 の一部が欠失していてもよい。この場合、欠失は各領域をコードする DNA の総ての欠失でも、あるいは各領域をコードする DNA の一部が欠失することにより、正常な機能を有する B5R 遺伝子産物が産生されなくなるような欠失でもよい。好適には、B5R 遺伝子の欠失は、B5R 遺伝子総ての欠失または膜貫通ドメイン総ての欠失である。また、B5R 遺伝子のプロモーターをも欠失させるのが望ましい。このような欠失は、公知の相同組換え法により行うことができる。

相同組換えとは、細胞内で 2 つの DNA 分子が同じ塩基配列介して相互に組換えを起こす現象で、ワクシニアウイルスのような巨大な ゲノム DNA を持つウイルスの組換えにしばしば用いられる方法である。まず、標的



とするワクシニアウイルス遺伝子部位の配列を中央で分断する形で、プロモーターと外来遺伝子を連結したプラスミド（これをトランスファーベクターという）を構築し、これを、ワクシニアウイルスを感染させた細胞に導入してやると、ウイルス複製の過程で裸になったウイルス DNA とトランスファーベクター上の同じ配列部分との間で入れ換えが起こり、挟み込まれたプロモーターと外来遺伝子がウイルスゲノム中に組み込まれる。例えばトランスファーベクターとして、ワクシニアウイルスの B4R 遺伝子から B6R 遺伝子の領域をプラスミドにクローニングし、B4R 遺伝子と B6R 遺伝子の間に位置する B5R 遺伝子の全領域を欠失させたプラスミド）または B5R 遺伝子の一部を欠失させたプラスミドを作製して、これをワクシニアウイルス感染細胞に導入する。細胞としては、BSC-1 細胞、HTK-143 細胞、Hep2 細胞、MDCK 細胞、Vero 細胞、HeLa 細胞、CV1 細胞、COS 細胞、RK13 細胞、BHK-21 細胞、初代ウサギ腎臓細胞等ワクシニアウイルスが感染しうる細胞を用い得る。また、ベクターの細胞への導入は、リン酸カルシウム法、カチオニックリポゾーム法、エレクトロポレーション法等の公知の方法で行えばよい。組換え体を同定しやすくするため、相同組換えにより分断され機能を失う導入部位の遺伝子には選択マーカーとなり得る遺伝子（例えば B5R 遺伝子、HA 遺伝子および TK 遺伝子等）を用いる場合が多い。ワクシニアウイルス遺伝子の塩基配列情報を基にトランスファーベクターを設計・作製し、該トランスファーベクターを用いて破壊しようとする遺伝子を相同組換えすればよい。トランスファーベクターは、D. M. Glover 他編、加藤郁之進 監訳 DNA クローニング 4—哺乳類のシステム—（第 2 版）TaKaRa 等に記載の方法に従って作製することができる。相同組換えを起こした相同組換え体の選別方法としては、選択した標的遺伝子によって、プラークサイズ（B5R 遺伝子の場合）、プラークの赤血球吸着の有無（HA 遺伝子）、BudR 薬剤耐性（TK 遺伝子）等の選択方法を用いればよい。あるいは、PCR 法でもサザンブロット法、ノーザンブロット法のいずれの方法をも用いることができる。

B5R 遺伝子産物は感染細胞表面およびウイルスのエンベロープに存在し、隣接の細胞、あるいは宿主体内の他の部位にウイルスが感染・伝播するときに、感染効率を高める働きをし、ウイルスのプラークサイズおよび宿主域にも関与している。例えば、B5R 遺伝子を欠失させると、RK13 細胞等の動物細胞に感染させた場合のプラークサイズが小さくなり、孵化鶏卵の漿尿膜上におけるポックサイズも小さくなる。また、Vero 細胞中でのウイルス増殖性は著しく低下する。さらに、ウサギに皮内投与したときの皮膚増殖能は低下し、皮膚病原性が低下する。従って、B5R タンパク質の機能が欠失しているかどうかは、RK13 細胞に感染させたときに形成されるプラークサイズ、ポックサイズ、Vero 細胞でのウイルス増殖性、ウサギにおける皮膚病原性等を指標に判断することができる。また、ワクシニアウイルスの遺伝子配列を調べてもよい。本発明のワクシニアウイルスは、B5R 遺伝子機能を有する Lister 株や LC16m0 株に比較して、動物細胞に感染させた場合のプラークサイズが小さくなり、ポックサイズが小さくなり、Vero 細胞でのウイルス増殖性、皮膚病原性等も低下しており、LC16m8 株と比較して、動物細胞に感染させた場合のプラークサイズ、ポックサイズが同等であり、ウサギ腎臓細胞でのウイルス増殖性、Vero 細胞でのウイルス増殖性、皮下病原性等も同等である。LC16m0 株と LC16m8 株をウサギ腎細胞に感染させた場合のプラークサイズを図 5 に、LC16m0 株と LC16m8 株（リクローニングされた LC16m8 株）のウサギにおける皮膚増殖性を図 9 に示す。さらに、B5R 遺伝子を欠失させると、動物に接種した場合の病原性も低下する。例えば、SCID マウスにウイルスを腹腔内接種し、経時的に体重を測定した場合、正常な機能を有する B5R 遺伝子産物を産生するウイルス株では、 $10^5$ PFU のウイルスを接種後 2 週間程度で発痘が認められ、体重が減少し始めるが、正常な機能を有する B5R 遺伝子産物を産生しないウイルス株では、 $10^7$ PFU のウイルスを接種しても発痘は認められず、体重の減少も認められない。また、動物に接種した場合の病原性を RED50（半数の個体に発痘を起こ

し得るウイルス量)を指標に調べた場合、正常な機能を有する B5R 遺伝子産物を産生するウイルス株では正常な機能を有する B5R 遺伝子産物を産生しないウイルス株に対して 2log 以上高い値を示す。図 10A、図 10B および図 11 に SCID マウスに対する病原性を示す。本発明における正常な機能を有する B5R 遺伝子産物とは、野生型 B5R 遺伝子がコードする遺伝子産物が有する機能と同一の機能を有する遺伝子産物であり、上記の性質を有する。

また、B5R 遺伝子を完全に欠失したウイルス株でも、感染防御能は B5R 遺伝子を有するウイルス株に比べ遜色ないという結果は得られているが(図 12)、B5R 遺伝子産物は、対痘瘡ワクチンの感染防御抗原として重要であるという報告もあるため、痘瘡ワクチンとして用いる場合は B5R 遺伝子産物の一部が産生されていたほうが望ましい可能性もある。従って、本発明のワクシニアウイルスにおいて、B5R 遺伝子とその発現産物の抗原性を維持したまま正常な機能が失われた形で発現されてもよい。このためには、B5R 遺伝子のうちの一部、例えば SCR1 から 4 の一部または全部のみが発現されるようにウイルスを設計すればよい。また、よりワクチンの抗原性を高めるためにこれらの領域がより多量に発現されるように設計してもよい。このためには、一部欠失させた B5R 遺伝子の上流に高発現プロモーターを機能し得る形で連結させればよい。用いるプロモーターとして、例えば PSFJ1-10、PSFJ2-16 や p7.5K プロモーター、p11K プロモーター、T7.10 プロモーター、CPX プロモーター、HF プロモーター、H6 プロモーター、T7 ハイブリッドプロモーターなどの他のボックスウイルス用高発現プロモーター等が挙げられる。

本発明において、B5R 遺伝子を完全に欠失した LC16m0 株、LC16m8 株をそれぞれ、m0 $\Delta$ B5R、m8 $\Delta$ B5R と称し、それぞれ、m0 $\Delta$ 、m8 $\Delta$ と称することがあり、B5R 遺伝子のなかの膜貫通ドメインを欠失し、上流にプロモーターを連結させ高発現性とした LC16m0 株、LC16m8 株をそれぞれ、m0proB5RdTM、m8proB5RdTM と称し、それぞれ m0dTM、m8dTM と称するこ

とがある。

LC16m0 株は、Lister 株から LC16 株を経て作出された株であり、LC16m8 株は、さらに LC16m0 株から作出された株である（蛋白質 核酸 酵素 Vol. 48 No. 12 (2003), p. 1693-1700）。Lister 株から LC16m8 株の単離は、図 2 に示すような工程で行われ、LC16m0 株および LC16m8 株は、千葉県衛生研究所、から入手することができる。

本発明の B5R 遺伝子を欠失した LC16m0 株および LC16m8 株は、リバーシジョンを起こすことなく安全な痘瘡ウイルスワクチンとして用いることができる。

また、本発明は、上記の B5R 遺伝子を欠失した LC16 株、LC16m0 株および LC16m8 株からなるワクシニアウイルスベクターを包含する。

該ベクターには、所望の外来遺伝子を導入することができる。上記の相同組換えの手法を用いることにより、理論的にはワクシニアウイルスゲノムのどの部位にも外来遺伝子を導入することができる。相同組換えは上述の方法で行えばよい。例えば、導入したい部位の DNA 配列中に導入すべき外来遺伝子を連結したプラスミド（トランスファーベクター）を作製し、これを、ワクシニアウイルスを感染させた細胞の中に導入すればよい。トランスファーベクターとして、例えば pSFJ1-10、pSFJ2-16、pMM4、pGS20、pSC11、pMJ601、p2001、pBCB01-3, 06、pTKgpt-F1-3s、pTM1、pTM3、pPR34, 35、pgpt-ATA18-2、pHES1-3 等を用いることができる。外来遺伝子の導入領域は、ワクシニアウイルスの生活環に必須でない遺伝子中であり、例えば赤血球凝集素 (HA) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、F フラグメント等が挙げられる。また、上記の B5R 遺伝子領域中 (B4R 遺伝子と B6R 遺伝子の間) に導入してもよい。導入する部分の遺伝子は、それが欠失することによりウイルスの形質に変化し組換え体の選択が容易になるものが望ましい。例えば、HA 遺伝子の場合では HA 遺伝子中に外来遺伝子が導入された組換え体では、HA 遺伝子が導入された外来遺伝子によって分断され、機能を失う。そのためプラークはニワ

トリの赤血球を吸着しなくなるため白く見えるようになるので、組換え体を容易に選別することができる。また、TK 遺伝子中に外来遺伝子が導入された組換え体では、TK 遺伝子の機能が失われ、5-プロモデオキシウリジン (BudR) が致死的に作用しないので、BudR により選別することができる。また、B5R 遺伝子中に外来遺伝子を導入した場合は、組換え体のプラークが小さくなるのでプラークのサイズで選別することができる。ワクシニアウイルスを感染させる細胞としては、Vero 細胞、HeLa 細胞、CV1 細胞、COS 細胞、RK13 細胞、BHK-21 細胞、初代ウサギ腎細胞、BSC-1 細胞、HTK-143 細胞、Hep2 細胞、MDCK 細胞等、ワクシニアウイルスが感染しうる細胞を用い得る。

また、外来遺伝子を導入する際、外来遺伝子の上流に適当なプロモーターを機能し得る形で連結させるのが望ましい。プロモーターは、限定はないが、上述の PSFJ1-10 や、PSFJ2-16、p7.5K プロモーター、p11K プロモーター、T7.10 プロモーター、CPX プロモーター、HF プロモーター、H6 プロモーター、T7 ハイブリッドプロモーター等を用いることができる。本発明のワクシニアウイルスベクターに外来遺伝子を導入する方法は、組換えワクシニアウイルスベクターを構築する公知の方法により行うことができ、例えば別冊 実験医学 ザ・プロトコールシリーズ 遺伝子導入&発現解析実験法 斎藤泉他編集、羊土社(1997年9月1日発行)、あるいは、D. M. Glover 他編、加藤郁之進 監訳 DNA クローニング 4-哺乳類のシステムー (第2版) TaKaRa、EMBO Journal (1987年 6巻 p. 3379-3384 等の記載に従えばよい。

このようにして、外来遺伝子を導入したワクシニアウイルスベクターを用いて該外来遺伝子を製造することができる。この際、外来遺伝子を導入したワクシニアウイルスベクターを適当な宿主細胞に感染させて該宿主細胞を培養すればよい。宿主細胞としては、上述の種々の動物細胞を用いることができる。培養は、動物細胞の公知の培養条件に従えばよい。

さらに、外来遺伝子としてウイルス、細菌、原虫および癌等の抗原をコードする遺伝子を導入することにより、外来遺伝子を導入したワクシニアウイルスベクターを種々のウイルス、細菌、原虫および癌に対するワクチンとして用いることができる。例えば、ヒト免疫不全ウイルス、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、ミコバクテリア、マラリア原虫、重症急性呼吸器症候群 (SARS=サーズ) ウイルス等の感染防御抗原 (中和抗原)、あるいは癌抗原をコードする遺伝子を導入すればよい。本発明は、これらの抗原を導入したワクシニアウイルスベクターも包含する。

さらに、本発明は、本発明の B5R 遺伝子が欠失したワクシニアウイルスを含む痘瘡ワクチン医薬組成物、本発明の B5R 遺伝子が欠失したワクシニアウイルスの痘瘡ワクチンとしての使用およびワクシニアウイルスを被験体に投与し、天然痘の感染を防御する方法を包含する。

本発明のワクチン医薬組成物の投与方法、投与量等は、既にワクチンとして用いられている公知のワクシニアウイルスワクチンと同様である。本発明のワクチン医薬組成物は、医薬的に有効量の本発明のワクシニアウイルスワクチンを有効成分として含んでおり、無菌の水性又は非水性の溶液、懸濁液、又はエマルションの形態であってもよい。さらに、塩、緩衝剤、アジュバント等の医薬的に許容できる希釈剤、助剤、担体等を含んでいてもよい。本発明のワクチン医薬組成物の投与は種々の非経口経路、例えば、皮下経路、静脈内経路、皮内経路、筋肉内経路、腹腔内経路、鼻内経路、経皮経路によればよいが、この中でも皮内投与が好ましい。医薬的な有効投与量は、所望の生物学的効果、この場合にはウイルス抗原に対する細胞性免疫応答又は体液性免疫応答の少なくとも一つを得るのに充分である量である。有効投与量は被験体の年齢、性別、健康、及び体重等により適宜決定することができる。例えば、限定されないが、ヒト成人に対して、投与当たり約  $10^2 \sim 10^{10}$  ポック形成単位 (PFU) 又はプラーク形成単位 (PFU)、好ましくは  $10^5 \sim 10^6$  ポック形成単位 (PFU) 又はプラーク形成単位 (PFU) である。

さらに、本発明は、B5R 遺伝子が欠失しており外来遺伝子を導入したワクシニアウイルスベクターであって、導入した外来遺伝子がウイルス、細菌、原虫および癌の抗原をコードする、ワクシニアウイルスのワクチン医薬組成物、および該ワクチンの使用および該ベクターを被験体に投与し、ウイルス、細菌、原虫および癌等の感染を防御あるいは治療する方法を包含する。該ワクチン医薬組成物の投与方法、投与量とは上述の痘瘡ワクチン医薬組成物に準ずればよい。

次に、本発明を実施例により具体的に説明する。

実施例 1 B5R 遺伝子欠失ミュータントおよび一部欠失 B5R 高発現組換え体の構築

B5R 遺伝子欠失用トランスファーベクター (pB4R+B6R) の構築

B4R の TA クローニング

m8 株の精製ゲノム DNA を鋳型として、2 つのプライマー (GATGCTGTTGTGCTGTGTTTGC (配列番号 3) と GTTAACACTGTCGAGCACTAAAAGG (配列番号 4)) によって B4R 遺伝子を増幅し、併せて orf の 3' 側に HpaI 部位を導入した。これを TA ベクター (pCR II) にクローニングした (pB4R+HpaI)。pB4R+HpaI の塩基配列を確認した後、これを鋳型に 2 つのプライマー (GATGCTGTTGTGCTGTGTTTGC (配列番号 5) と TTGTGTGGAATTGTGAGCGGA (配列番号 6)) によって B4R 遺伝子全領域と TA ベクターのマルチクローニング部位を増幅した。この PCR 産物を精製後、T4DNA ポリメラーゼで両端を平滑化した (B4R+HpaI フラグメント)。

B6R の TA クローニング

m8 株の精製ゲノム DNA を鋳型として、2 つのプライマー (GTTAACGTTCCATAAATTGCTACCG (配列番号 7) と GTGTGACCTCTGCGTTGAATAG (配列番号 8)) によって B6R 遺伝子を増幅し、併せて orf の 5' 側に HpaI 部位を導入した。これを TA ベクターにクローニングした (pB6R+HpaI)。

## B4R と B6R の連結

pB6R+HpaI の塩基配列を確認した後、HpaI で消化し、BAP で脱リン酸化した。次に、B4R+HpaI フラグメントと混合しライゲーションした。この混合物を鋳型にして、プライマー ps/hr-s1 (TCGGAAGCAGTCGCAACAAC (配列番号 9)) と ps/hr-as1 (ATACCATCGTCGTTAAAAGCGC (配列番号 10)) によって、連結した B4R 遺伝子と B6R 遺伝子の一部領域を増幅した。この PCR 産物を TA ベクターにクローニングし、塩基配列を確認した (pB4R+B6R)。

一部欠失 B5R 高発現組換え体用トランスファーベクター (pB4R+B6R proB5RdTM) の構築

m0 株の精製ゲノム DNA を鋳型として、2 つのプライマー ( ATGAAAACGATTTCCGTTGTTACG (配列番号 11) と TCAATGATAAGTTGCTTCTAACGA (配列番号 12)) によって B5R 遺伝子の ectodomain 領域 (SCR1 から SCR4 までの領域) のみを増幅し、これを TA ベクターにクローニングした (pB5RdTM)。pB5RdTM の塩基配列を確認した後、制限酵素 PstI で切断した後、T4DNA ポリメラーゼで平滑化し、さらに SacI で切断して B5RdTM フラグメントを切り出した。これを SmaI と SacI で消化したトランスファーベクター pSFJ1-10 に連結した (pSFJdTM)。次に pSFJdTM を HpaI と SacI で消化して、プロモーター+B5RdTM のフラグメント (proB5RdTM) を切り出した。これを、HpaI と SacI で消化した pB4R+B6R に連結した (pB4R+B6R proB5RdTM)。

## 組換えウイルスの作成

35mm ディッシュに 80%コンフルエントに培養された RK13 細胞または PRK 細胞にワクシニアウイルス (m8B5R の場合は m8 株、m8Δ と m8proB5RdTM の場合は m8B5R、m0Δ と m0proB5RdTM の場合は m0 株) を moi=0.02 で感染させ、室温で 1 時間吸着後、LipofectAMINE PLUS (Invitrogen) と混合したトランスファーベクタープラスミド DNA (m8B5R の場合は pB5R、m8



△と m0△の場合は pB4R+B6R、m8proB5RdTM と m0proB5RdTM の場合は pB4R+B6R proB5RdTM) をマニュアルに従って細胞に添加して取り込ませ、34℃にて2日間培養した。細胞を凍結融解後、ソニケーションし、ほぼコンフルエントになった RK13 細胞に適当に希釈して接種し、0.8%メチルセルロースを含む Eagle MEM, 5%FCS 培地を加え、34℃で2から3日間培養した。ニュートラルレッドを最終濃度 0.01%になるように加え、34℃で3時間細胞を染色した後、培地を除き、フェノールレッドを含まない Eagle MEM 培地で2度細胞面を洗い、m8B5R の場合はラージプラークを、m8△、m8proB5RdTM、m0△および m0proB5RdTM の場合はスモールプラークをチップの先で掻き取り、Eagle MEM 培地に浮遊させた。採取したプラークの浮遊液をソニケーション後、その 200μL を 15,000rpm、30 分間遠心し、沈査に 50μL の滅菌蒸留水または 10mMTris-HCl (pH7.5) を添加した。30 秒間ソニケーション後、95℃で10分間加熱してゲノム DNA を抽出し、PCR によるスクリーニングに供した。m8△と m0△の場合は ps/hr-sl と ps/hr-asl によって、m8proB5RdTM と m0proB5RdTM の場合は ps/hr-sl と B5R793as (GATCCGAAGAATGATATCCC) (配列番号 13) によって PCR を行い、所定の大きさの PCR プロダクトが検出されたクローンについて、PCR プロダクトの塩基配列をダイレクトシーケンスにより確認した。塩基配列に問題が無いクローンを選択し、RK13 細胞にてさらに2から3回プラーク純化した。全てのウイルスは RK13 細胞にて大量培養した後、35 (W/V) % シュークロースクッションを用いた超遠心によって精製濃縮し、RK13 細胞にてウイルス力価を測定し、実験に供した。

図 6 に B5R 遺伝子を欠失したウイルスの構築図を示す。

実施例 2 B5R 遺伝子欠失ミュータントおよび一部欠失 B5R 高発現組換え体における B5R タンパク質の発現の確認

4 種類の改良型ウイルス (m8△、m0△、m8proB5RdTM、m0proB5RdTM) を、RK13 細胞に moi=10 で感染させ、感染後1日の感染細胞画分の B5R タンパク質発現をウエスタンブロットで確認した (図 7 a)。ウエスタン

ブロットの一次抗体には抗 B5R ラットモノクローナル抗体 (SCR2 領域を認識) を用い、ECL Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences K.K.) で特異的なバンドを検出した。

m8B5R (m8 株に野生型 B5R 遺伝子を導入したもの) と m0 株では同じ分子量の B5R タンパク質のバンドが確認され、高発現タイプの改良型ウイルス (m8proB5RdTM、m0proB5RdTM では、短い B5R 産物の発現が確認された。m8rc (リクローニングした m8 株)、m8Δ および m0Δ では、B5R 遺伝子産物は検出されなかった (図 7 a)。

さらに、培養上清中に分泌された B5R 蛋白質を検出するため、上記と同じ培養条件で、m8proB5RdTM、m0proB5RdTM、m8B5R、m0、LC16、Wyeth 株を感染させ、培養した培養上清を 12.5%TCA で濃縮し、ウエスタンブロットで確認した (図 7b)。1 次抗体には抗 B5R ウサギポリクローナル抗体を用い、ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences K.K.) で検出した。細胞画分は全体の 1/40 量、培養上清は 1/10 量をアプライした。

TM ドメインを欠く B5R 蛋白質を発現する m8proB5RdTM と m0proB5RdTM では細胞画分に比して大量の B5R 蛋白質が培養上清画分に検出されたのに対し、他のウイルス株では分子量の小さい (約 35Kd) B5R 蛋白質が細胞画分と同程度の量検出された。

### 実施例 3 リバートアント出現頻度の確認

4 種類の改良型ウイルス (m8Δ、m0Δ、m8proB5RdTM、m0proB5RdTM) を製造用細胞である PRK に moi=1.0 で 7 代まで、それぞれ 30℃ と 34℃ で継代培養した後、34℃ で vero 細胞に 2 代継代培養し、リバートアントの出現の有無を、RV 含有量を測定して確認した。リバートアント含有量は、RK13 細胞でのウイルス力価に対する vero 細胞によるウイルス力価の比として計算した。対照としてリクローニングした m8 株 (m8rc) を用いた。図 8 にリバートアントの出現頻度を示す。

4 種類の改良型ウイルスでは PRK 細胞に 7 代継代してもさらにその後

に vero 細胞でリバータントを選択的に増幅させてもリバータントは出現せず、リバージョンが起こりにくいウイルスであることが証明された。

一方、リクローニングされた m8 株 (m8rc) からはリバータントが検出され、vero 細胞でリバータントを選択的に増幅すると、m8rc では PRK 細胞 1 代培養ですでにリバータントが出現しており、m8 株では容易にリバージョンが起こることが判明した。

#### 実施例 4 改良型ウイルスのウサギにおける皮膚増殖性

改良型ウイルス (m8 $\Delta$ 、m0 $\Delta$ 、m8proB5RdTM、m0proB5RdTM) について、ウサギ皮膚接種試験で、ErD50 (Erythema Dose50、接種部位の 50%に 1cm 以上の発赤を起しうるウイルス量) を測定し、皮膚での増殖性を評価した。対照として、m0 株、m8rc および m8 株に野生型 B5R 遺伝子を導入した m8B5R を用いた。

3.5kg 以上の日本白色種の背中の毛を刈り、硫化バリウムで完全に除毛した翌日、10 倍階段希釈したウイルスを 0.1mL ずつ皮内接種した。1 羽当り 2 系列、うち 1 系列は肩から尻へ、もう 1 系列は逆方向に、高ドーズから低ドーズへと接種した。1 サンプル当り 2 羽 (4 箇所/ドーズ) 用いた。接種後毎日、7 日間、接種部位の発赤径を計測し、10mm を超える発赤を陽性として極期の反応を基に ErD50 を the Reed and Muench method によって算出した。図 9 にウサギにおける皮膚増殖性を示す。

B5R 遺伝子が活性を持つウイルス (m8B5R、m0 株) は皮膚での増殖力が強く ErD50 値が低い (1.00, 2.25) のに対し、B5R 遺伝子を欠いたウイルス (m8rc, m8 $\Delta$ , m0 $\Delta$ ) では皮膚増殖能が低下して ErD50 値が高くなる (5.83, 5.50, 6.00) ことが示され、B5R 遺伝子が皮膚増殖性に直接関わっていることが裏付けられた。TM 領域を欠失した B5R を発現する組換え体 (m8proB5RdTM, m0proB5RdTM) においても、野生型 B5R を発現する対照ウイルス (m8B5R, m0) に比べて高い ErD50 値 (4.75, 5.00) を示し、m8rc, m8 $\Delta$ , m0 $\Delta$  と同程度に皮膚増殖性が大きく減弱していることが示された。

## 実施例 5 SCID マウスにおける感染実験

1 群 4 匹の 6 週令 BALB/cSCID マウス（雌）に、m8 $\Delta$ 、m0 $\Delta$ 、m8dTM、および m0dTM 株をそれぞれ  $10^7$  から  $10^9$ PFU/dose で腹腔内接種し、接種後 5 週まで体重減少と発症の有無を観察した。対照として、PBS 接種群とは乳類細胞では一段増殖しかできない MVA 株を  $10^7$  から  $10^9$ PFU/dose、リクローニングした m8 株 (m8rc) を  $10^7$  から  $10^9$ PFU/dose、m0 株および m8 株に m0 株の B5R 遺伝子を組み込んだ m8B5R を  $10^4$  から  $10^6$ PFU/dose、現在アメリカで使用されているワクチン株 Wyeth 株を  $10^3$  から  $10^5$ PFU/dose、を接種して同様の観察を行った（図 10A、図 10B および図 11）。

図 10A および図 10B はマウスの体重減少を示している。m8 $\Delta$ 、m0 $\Delta$ 、m8dTM、および m0dTM 株接種群のうち  $10^8$ PFU/dose 接種群では若干の体重減少を示しているが、 $10^7$ PFU/dose 接種群では PBS 接種群、MVA 接種群と同様に全く体重減少を認めず、発症もしなかった。一方、B5R 遺伝子の活性を持つ m0 株、m8B5R 株、Wyeth 株接種群では  $10^5$ PFU/dose 接種群でも接種後 2 週間で発症が始まり、それに伴い体重が減少始まった。特に m0 株接種群では、いずれの dose においても接種後 4 週までにほとんどの個体が死亡した。

体重減少以外に、ウイルス株の SCID マウスに対する病原性の指標として、半数の個体に発症を起こしうるウイルス量として、Rash Expression Dose 50 (RED50) という値を設定した。図 11 は、その経時的変化を表したものである。その結果、B5R 遺伝子の機能を欠損した 5 株（m8 $\Delta$ 、m0 $\Delta$ 、m8dTM、m0dTM、m8rc）はいずれもほぼ同じ値を示し、B5R 活性を持つ 3 株（m0、m8B5R、Wyeth）より 2log 以上高い値を示した。また発症が始まる時期にも数日間の開きがあった。これらの 5 株では、通常人体に投与される接種量の 10 倍から 100 倍に当たる  $10^7$ PFU/dose を接種した群では、全く発症を認めず、体重減少も見られず、これらの株の高い安全性が証明された。

## 実施例 6 BALB/c マウスにおける感染防御実験

m8Δ、m0Δ株について、天然痘ワクチンとしての効果を評価するために、BALB/c マウスでの感染防御実験を行った。1群8匹の6週令 BALB/c マウス（雌）の筋肉内にそれぞれのウイルスを  $10^4$  から  $10^6$  PFU/dose 接種し、接種後4週目に致死量（ $10^6$  PFU/dose）のワクシニアウイルス強毒株 Western Reserve (WR) 株を経鼻感染させ、攻撃後の体重減少を測定した（図12）。対照として、アメリカの現行ワクチン株 Wyeth と m8rc、MVA を用いた。

m8Δ、m0Δ株ではいずれの dose においても Wyeth 株同様、攻撃後4日目に一過性の体重減少を認めたものの、完全に耐過し、死亡する個体もいなかった。一方 MVA 株接種群では  $10^4$ 、 $10^5$  PFU 接種群では顕著な体重減少が見られ、 $10^6$  PFU 接種群でも若干の体重減少が認められた。 $10^4$  PFU 接種群では2匹が死亡した。これらの結果から m8Δ株、m0Δ株はいずれも現行の天然痘ワクチンと遜色ない免疫原性を備えることが確認された。

## 産業上の利用可能性

本発明により、皮膚増殖性のような病原性が減じられ、かつリバーションを起こしにくい、より安全性の高い痘瘡ワクチンウイルスを提供することが可能となった。これにより痘瘡ワクチンの製造工程管理をより確実に行うことが可能となり、ワクチン製造において大きなメリットがある。また、品質の安定した安全な痘瘡ワクチンの供給は国の危機管理においても重要である。さらに、ワクシニアウイルスは痘瘡ワクチンとしての用途以外に、組み換え生ワクチンや発現ベクター系としての利用法が実用化されつつあり、新興再興感染症に対するワクチンや診断薬等の開発にも重要なツールになりうることから、応用面からも m8株の改良は意義が大きい。

本明細書に引用されたすべての刊行物は、その内容の全体を本明細書に取り込むものとする。また、添付の請求の範囲に記載される技術思想および発明の範囲を逸脱しない範囲内で本発明の種々の変形および変更が可能であることは当業者には容易に理解されるであろう。本発明はこのような変形および変更をも包含することを意図している。

## 請求の範囲

1. ワクシニアウイルス株 LC16 株、LC16m8 株または LC16m0 株の B5R 遺伝子の一部または全部が欠失しており、正常な機能を有する B5R 遺伝子産物を産生しないワクシニアウイルスからなる痘瘡ワクチンであって、正常な機能を有する B5R 遺伝子産物の産生を引き起こす復帰突然変異を起こしにくい痘瘡ワクチンウイルス。
2. B5R 遺伝子を完全に欠失している、請求項 1 に記載の痘瘡ワクチンウイルス。
3. B5R 遺伝子の一部が欠失し、正常な機能を有する B5R 遺伝子発現産物が産生されない、請求項 1 または 2 に記載の痘瘡ワクチンウイルス。
4. RK13 細胞に感染させたときのプラークサイズおよびウサギに投与したときの皮下増殖性が LC16m8 株と同等である請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の痘瘡ワクチンウイルス。
5. B5R 遺伝子の一部が欠失し、該 B5R 遺伝子の上流にプロモーターが連結され、B5R 遺伝子の一部が発現するが、該発現産物は B5R 遺伝子発現産物の正常な機能を失っている、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の痘瘡ワクチンウイルス。
6. B5R 遺伝子の膜貫通ドメインが欠失している、請求項 3 から 5 のいずれか 1 項に記載の痘瘡ワクチンウイルス。
7. プロモーターが PSFJ1-10、PSFJ2-16 または他のボックスウイルス用高発現プロモーターである、請求項 5 または 6 に記載の痘瘡ワクチンウイルス。
8. B5R 遺伝子のうち膜貫通ドメインの全部または一部が欠失しているワクシニアウイルスよりなる痘瘡ワクチンウイルス。
9. B5R 遺伝子の上流にプロモーターが連結し、B5R 遺伝子の一部が発現するが、該発現産物は B5R 遺伝子発現産物の正常な機能を失っている、請求項 8 記載の痘瘡ワクチンウイルス。
10. プロモーターが PSFJ1-10、PSFJ2-16 または他のボックスウイル

ス用高発現プロモーターである、請求項 8 または 9 に記載の痘瘡ワクチンウイルス。

1 1. 請求項 1 から 1 0 のいずれか 1 項に記載の痘瘡ワクチンウイルスを含む痘瘡ワクチン医薬組成物。

1 2. ワクシニアウイルス株 LC16 株、LC16m8 株または LC16m0 株の B5R 遺伝子の一部または全部が欠失しており、正常な機能を有する B5R 遺伝子産物を産生しないワクシニアウイルスベクターであって、正常な機能を有する B5R 遺伝子産物の産生を引き起こす復帰突然変異を起こしにくいワクシニアウイルスベクター。

1 3. B5R 遺伝子を完全に欠失している、請求項 1 2 に記載のワクシニアウイルスベクター。

1 4. B5R 遺伝子の一部が欠失し、正常な機能を有する B5R 遺伝子発現産物が産生されない、請求項 1 2 または 1 3 に記載のワクシニアウイルスベクター。

1 5. ウサギ腎臓細胞に感染させたときのプラークサイズおよびウサギに投与したときの皮下増殖性が LC16m8 株と同等である請求項 1 2 から 1 4 のいずれか 1 項に記載のワクシニアウイルスベクター。

1 6. B5R 遺伝子の一部が欠失し、該 B5R 遺伝子の上流にプロモーターが連結され、B5R 遺伝子の一部が発現するが、該発現産物は B5R 遺伝子発現産物の正常な機能を失っている、請求項 1 2 から 1 5 のいずれか 1 項に記載のワクシニアウイルスベクター。

1 7. B5R 遺伝子の膜貫通ドメインが欠失している、請求項 1 2 から 1 6 のいずれか 1 項に記載のワクシニアウイルスベクター。

1 8. プロモーターが PSFJ1-10、PSFJ2-16 または他のボックスウイルス用高発現プロモーターである、請求項 1 6 または 1 7 のワクシニアウイルスベクター。

1 9. B5R 遺伝子のうち膜貫通ドメインの全部または一部が欠失しているワクシニアウイルスベクター。



20. B5R 遺伝子上流にプロモーターが連結し、B5R 遺伝子の一部が発現するが、該発現産物は B5R 遺伝子発現産物の正常な機能を失っている、請求項 19 記載のワクシニアウイルスベクター。

21. プロモーターが PSFJ1-10、PSFJ2-16 または他のボックスウイルス用高発現プロモーターである、請求項 19 または 20 に記載のワクシニアウイルスベクター。

22. 外来遺伝子を含む請求項 12 から 21 のいずれか 1 項に記載のワクシニアウイルスベクター。

23. 外来遺伝子がウイルス、細菌、原虫または癌の抗原である請求項 22 記載のワクシニアウイルスベクター。

24. 請求項 23 記載のワクシニアウイルスベクターを含む、ウイルス、細菌、原虫または癌用ワクチンウイルス医薬組成物。



[GENETYX-MAC: Multiple Alignment]

```

B5R/m0. txt      801 GTCTGTGAACAGATAAATGGAATACGAAATCCATCGAAGAAATGTGCACAGTTTCTGATTATGCTCTGAATTATATGATAAGCG-A-TT-ATACG 897
B5R/m8R1. txt    801 .....C.-.-.....- 897
B5R/m8R2. txt    801 .....-A.-.....- 897
B5R/m8R3. txt    801 .....-T.....- 897
B5R/m8. txt      801 .....-.-.....- 896
                ***** * * *
B5R/m0. txt      898 AAGTGAATTCACCATGACACTAAGTTGCAACGGGGAACAAATAATTTTCGTTGCGAAGAAAAAATGGAAATACTTCTTGGAAATGATACTGTACGTG 997
B5R/m8R1. txt    898 ..... 997
B5R/m8R2. txt    898 ..... 997
B5R/m8R3. txt    898 ..... 997
B5R/m8. txt      897 ..... 996
                *****

```

2

B5R/m0. aa	1	MKTISVWLLCMLPAVVSTCTVPTMNAKL	TSTETSRNDKQKVTFTQGGYHSLDPNAV	CETDKWKYENPCCKMCTVSDYVSEL	YDKPL YENSTMTLS	100
B5R/m8R1. aa	1	.....	.....	.....	..IQ.....	100
B5R/m8R2. aa	1	.....	.....	.....	..IQ.....	100
B5R/m8R3. aa	1	.....	.....	.....	..FIQ.....	100
		*****	*****	*****	*****	*****
B5R/m0. aa	101	CNGETKYFRCEEKNGNTSWINDTVTC	PNACQPLQLEHGSCQPWKEYSFGEYMT	INCQDVGEVIGASYISCTANSINNV	IPSCQCKGDMPSL SNGL I SGST	200
B5R/m8R1. aa	101	.....	.....	.....	.....	200
B5R/m8R2. aa	101	.....	.....	.....	.....	200
B5R/m8R3. aa	101	.....	.....	.....	.....	200
		*****	*****	*****	*****	*****
B5R/m0. aa	201	FSIGGV IHL SCKSGFTLGSPSTC	IGKINWP ILPTCVRSNENKDPVDDG	PPDETDL SKL SKDWQYEQE	IESLEATYHI I VAL TINGVIFL ISVIVLV	300
B5R/m8R1. aa	201	.....	.....	.....	.....	300
B5R/m8R2. aa	201	.....	.....	.....	.....	300
B5R/m8R3. aa	201	.....	.....	.....	.....	300
		*****	*****	*****	*****	*****
B5R/m0. aa	301	CSQDKNQYKFKLLP				317
B5R/m8R1. aa	301	.....				317
B5R/m8R2. aa	301	.....				317
B5R/m8R3. aa	301	.....				317
		*****				*****

図 3

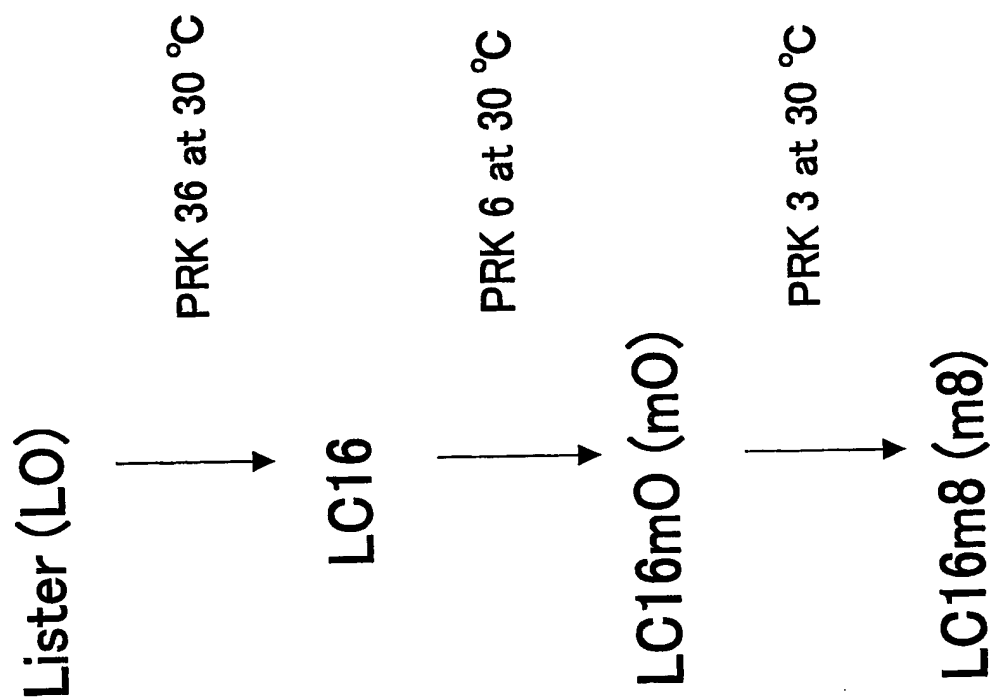


図4

	Lister	LC16m0	LC16m8
ts	弱	強	強
ポックサイズ	大	中	小
神経毒性	中	非常に低	非常に低
皮膚増殖性	中	中	弱
抗体産生	中	強	中

図5

リバータントウイルスのプラークサイズ

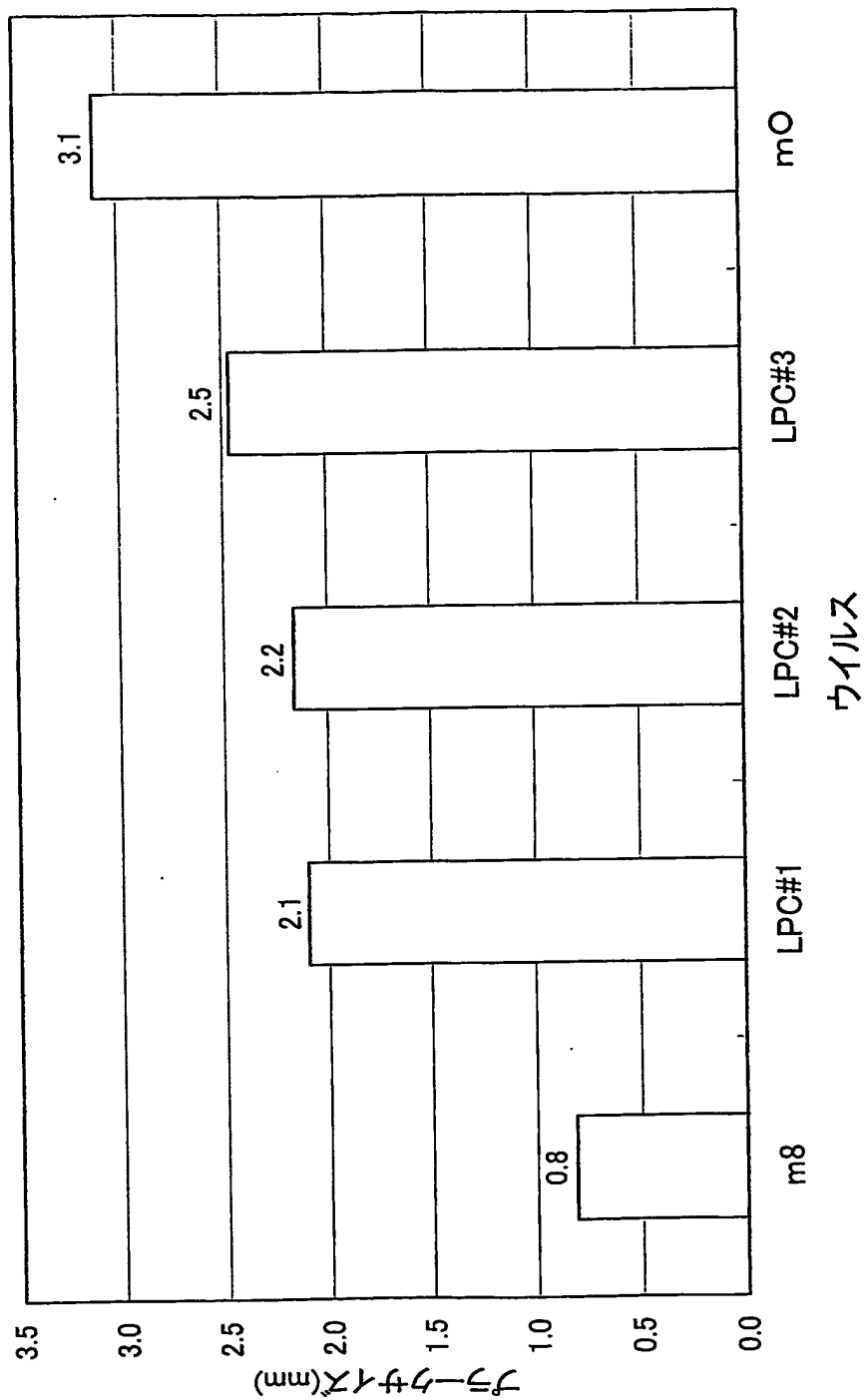
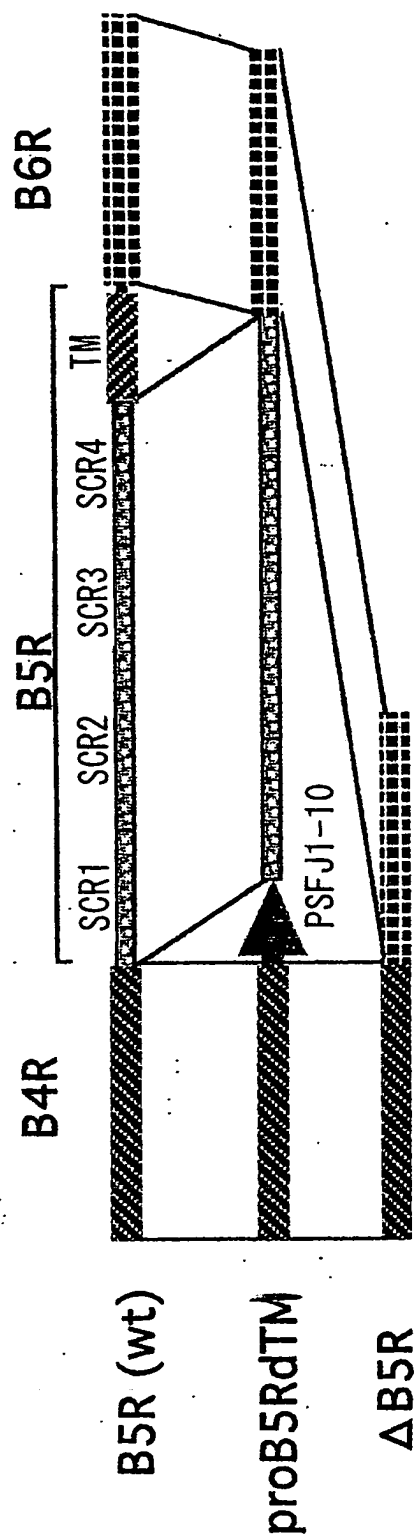


図 6



SCR : Short Consensus Region, TM : Transmembrane Domain

図7a



図7b

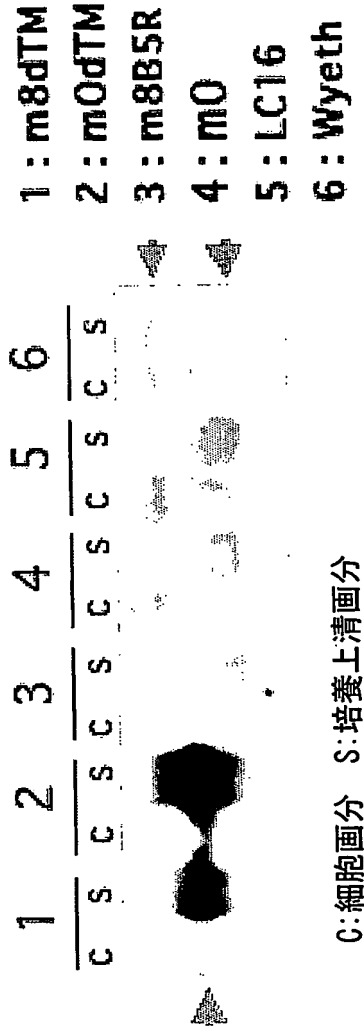




図8

細胞継代培養によるRVの出現頻度 (PRK7代, vero2代)

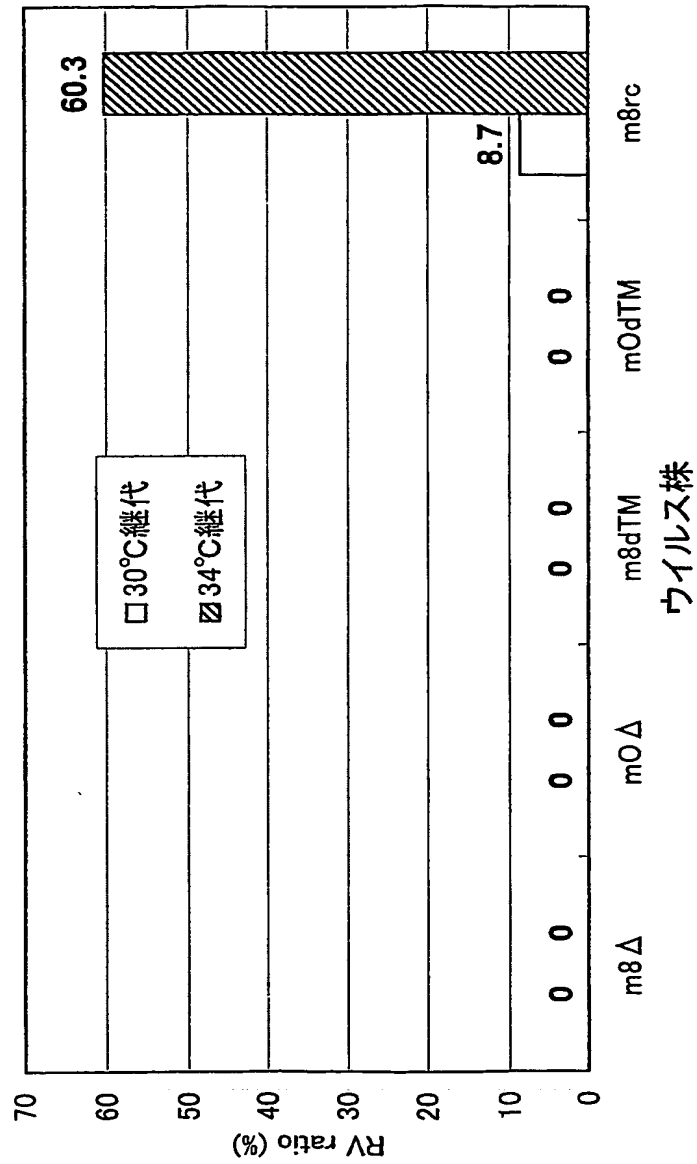


図 9

ウサギにおける皮膚増殖性 (ErD50)

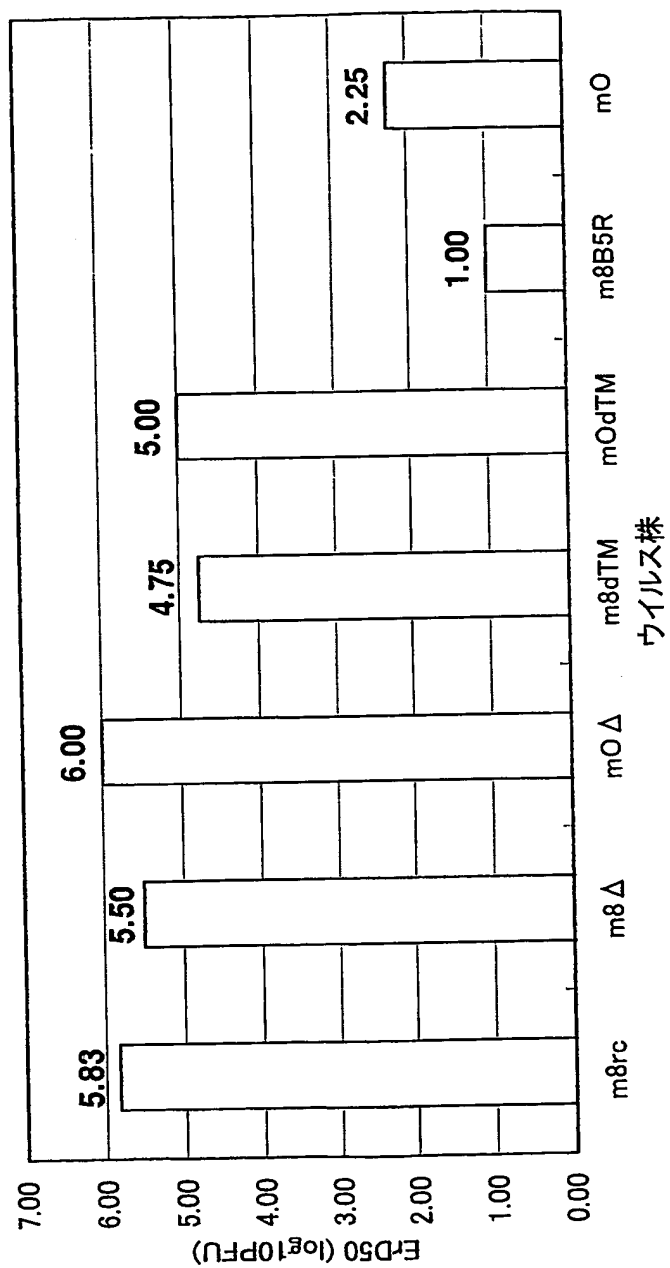


図 10A

SCIDマウスにおける病原性(体重減少) 1

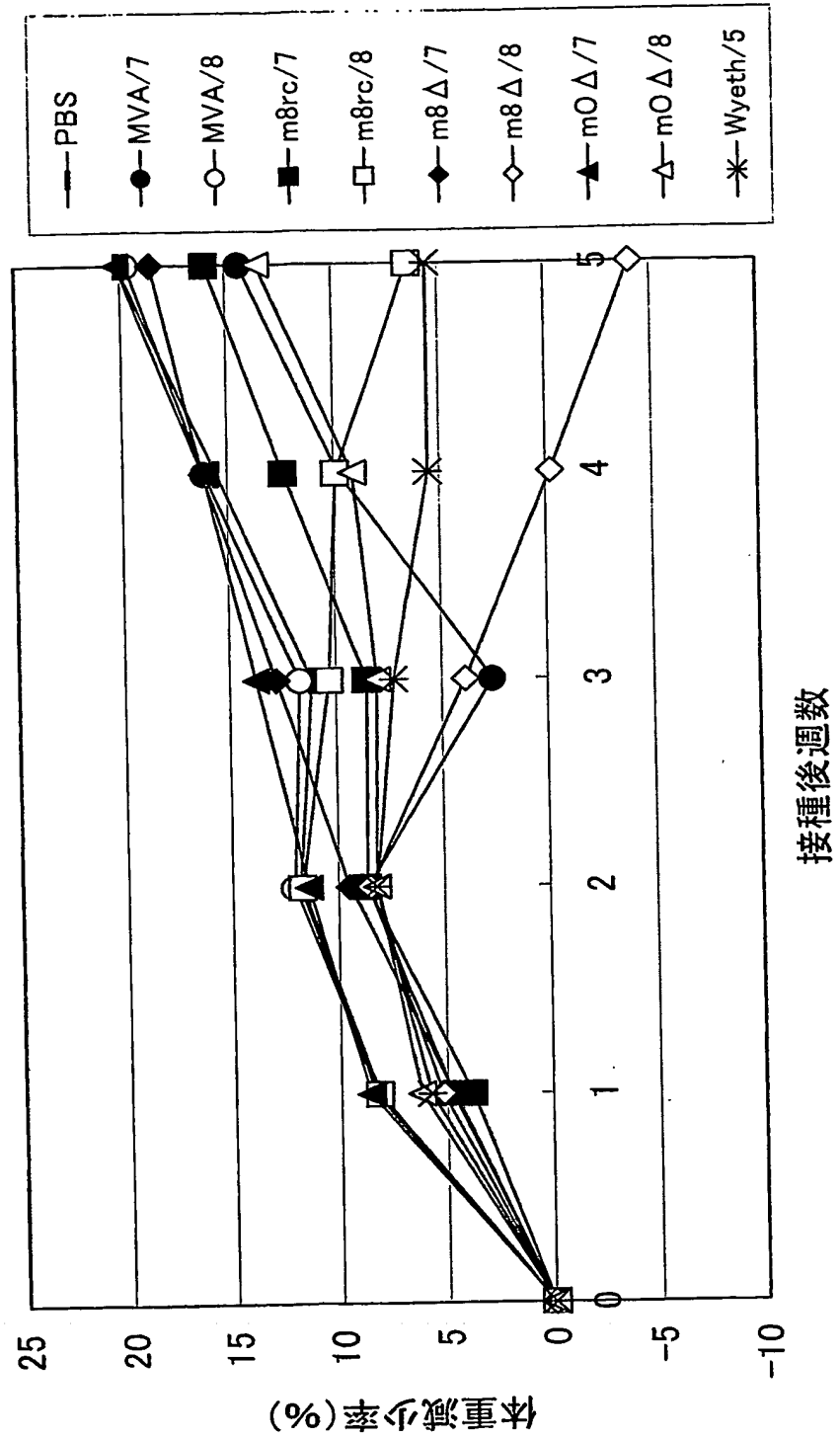


図10B

SCIDマウスにおける病原性(体重減少)2

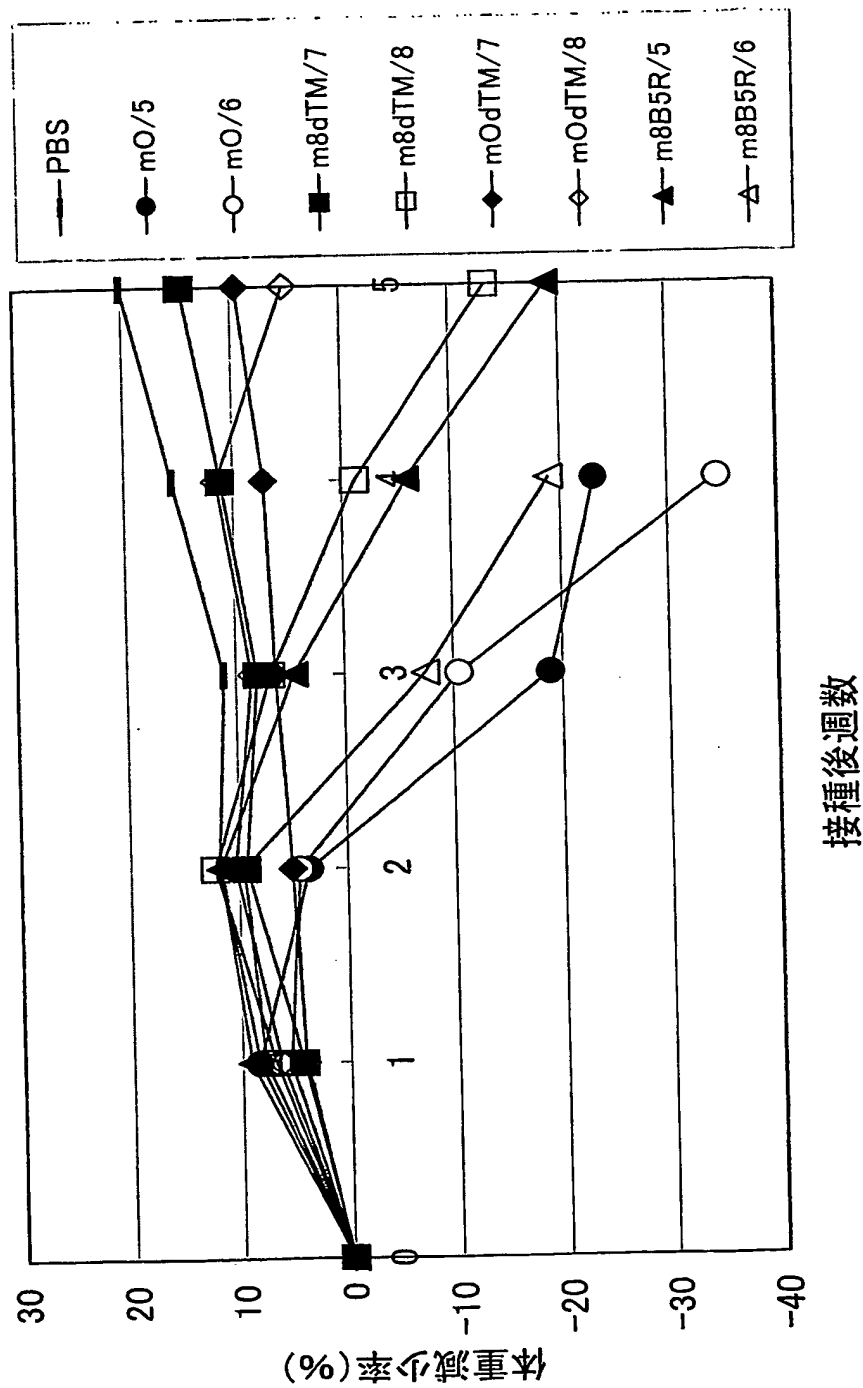


図 11

SCIDマウスに対する病原性 (RED50)

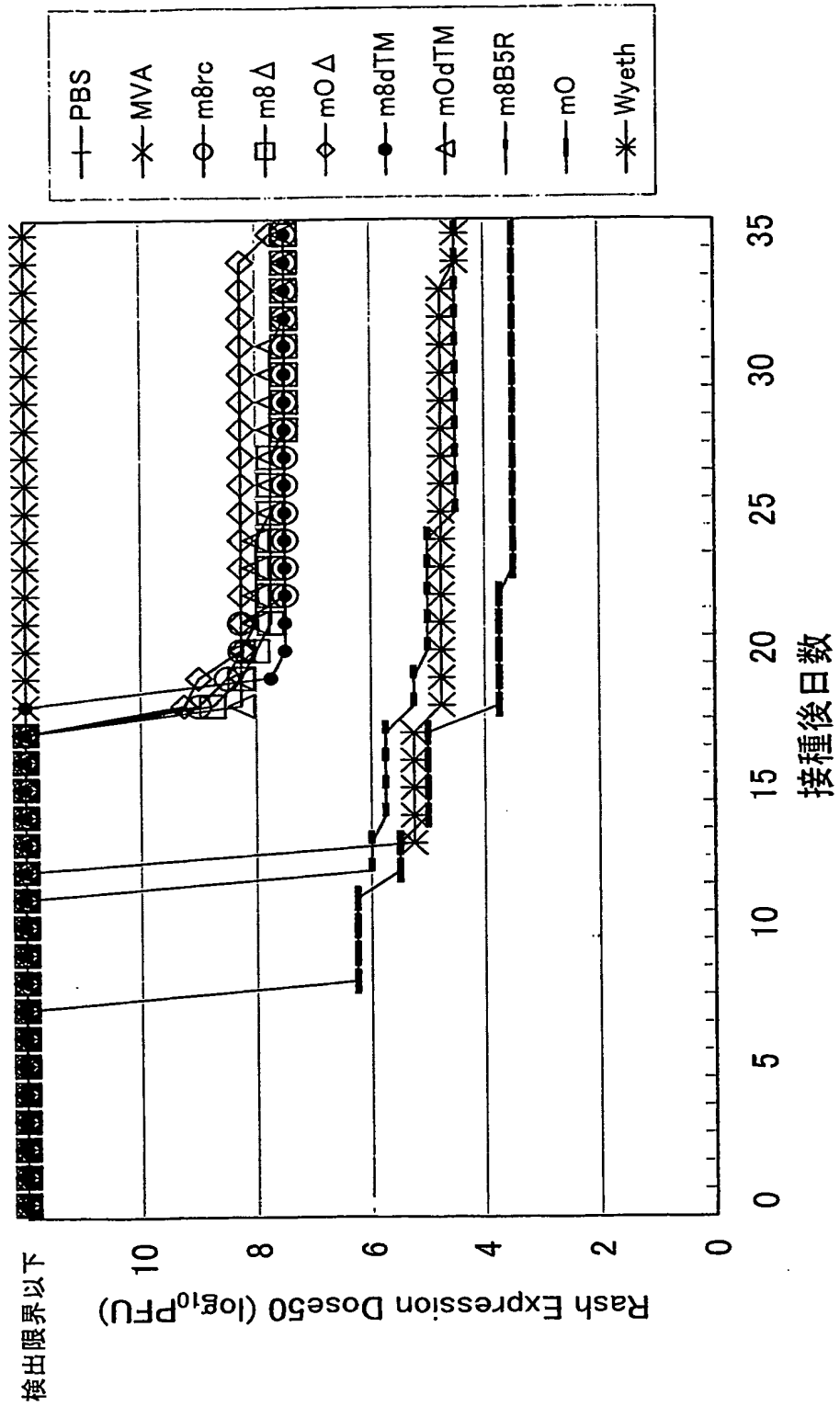
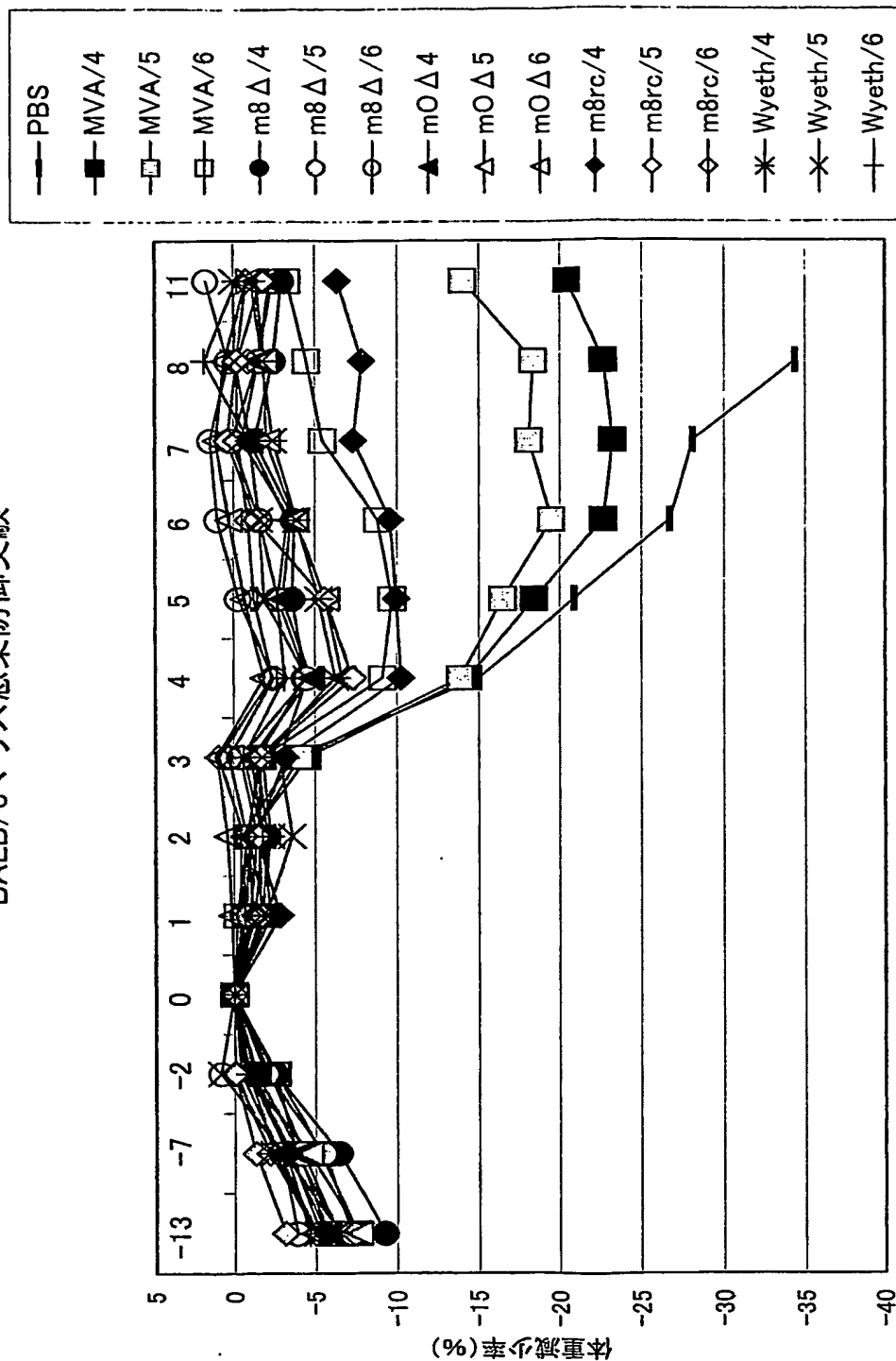


図 12

BALB/cマウス感染防御実験



## SEQUENCE LISTING

<110> HOKKAIDO TECHNOLOGY LICENSING OFFICE CO., LTD

<110> Japan as represented by Director General of National Institute of Infectious Diseases

<120> Highly safety variola virus and vaccine virus vector

<130> PH-1947-PCT

<140>

<141>

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 197

<212> DNA

<213> Vaccinia virus

<400> 1

gtctgtgaaa cagataaatg gaaatacgaa aatccatgca agaaaatgtg cacagtttct 60  
gattatgtct ctgaattata tgataagcca ttatacgaag tgaattccac catgacacta 120  
agttgcaacg gcgaaacaaa atatatttcgt tgccaagaaa aaaatggaaa tacttcttgg 180  
aatgatactg ttacgtg 197

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 317

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Vaccinia virus

&lt;400&gt; 2

Met Lys Thr Ile Ser Val Val Thr Leu Leu Cys Val Leu Pro Ala Val

1 5 10 15

Val Tyr Ser Thr Cys Thr Val Pro Thr Met Asn Asn Ala Lys Leu Thr

20 25 30

Ser Thr Glu Thr Ser Phe Asn Asp Lys Gln Lys Val Thr Phe Thr Cys

35 40 45

Asp Gln Gly Tyr His Ser Leu Asp Pro Asn Ala Val Cys Glu Thr Asp

50 55 60

Lys Trp Lys Tyr Glu Asn Pro Cys Lys Lys Met Cys Thr Val Ser Asp

65 70 75 80

Tyr Val Ser Glu Leu Tyr Asp Lys Pro Leu Tyr Glu Val Asn Ser Thr

85 90 95

Met Thr Leu Ser Cys Asn Gly Glu Thr Lys Tyr Phe Arg Cys Glu Glu

100 105 110

Lys Asn Gly Asn Thr Ser Trp Asn Asp Thr Val Thr Cys Pro Asn Ala

115 120 125



Glu Cys Gln Pro Leu Gln Leu Glu His Gly Ser Cys Gln Pro Val Lys  
130 135 140

Glu Lys Tyr Ser Phe Gly Glu Tyr Met Thr Ile Asn Cys Asp Val Gly  
145 150 155 160

Tyr Glu Val Ile Gly Ala Ser Tyr Ile Ser Cys Thr Ala Asn Ser Trp  
165 170 175

Asn Val Ile Pro Ser Cys Gln Gln Lys Cys Asp Met Pro Ser Leu Ser  
180 185 190

Asn Gly Leu Ile Ser Gly Ser Thr Phe Ser Ile Gly Gly Val Ile His  
195 200 205

Leu Ser Cys Lys Ser Gly Phe Thr Leu Thr Gly Ser Pro Ser Ser Thr  
210 215 220

Cys Ile Asp Gly Lys Trp Asn Pro Ile Leu Pro Thr Cys Val Arg Ser  
225 230 235 240

Asn Glu Lys Phe Asp Pro Val Asp Asp Gly Pro Asp Asp Glu Thr Asp  
245 250 255

Leu Ser Lys Leu Ser Lys Asp Val Val Gln Tyr Glu Gln Glu Ile Glu  
260 265 270

Ser Leu Glu Ala Thr Tyr His Ile Ile Ile Val Ala Leu Thr Ile Met  
3/8

275

280

285

Gly Val Ile Phe Leu Ile Ser Val Ile Val Leu Val Cys Ser Cys Asp

290

295

300

Lys Asn Asn Asp Gln Tyr Lys Phe His Lys Leu Leu Pro

305

310

315

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

&lt;400&gt; 3

gatgctgttg tgctgtgttt gc

22

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

&lt;400&gt; 4

gttaacactg tcgagcacta aaagg

25

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

&lt;400&gt; 5

gatgctgttg tgctgtgttt gc

22

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

&lt;400&gt; 6

ttgtgtggaa ttgtgagcgg a

21

&lt;210&gt; 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 7

gttaacgttc cataaattgc taccg

25

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 8

gtgtgacctc tgcgttgaat ag

22

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 9

tcggaagcag tcgcaaaca c

21

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 10

ataccatcgt cgtaaagc gc

22

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 11

atgaaaacga tttccgttgt tacg

24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 12

tcaatgataa gttgcttcta acga

24

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 13

gatccgaaga atgatatccc

20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15632

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N7/01, C12N15/863, A61K39/285

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Masanobu SUGIMOTO et al., "Kokusan Ten'nento Vaccine no Aratana Yakuwari", Protein, Nucleic acid and Enzyme, September, 2003, Vol.48, No.12, pages 1693 to 1701	1-24
Y	WO 90/12101 A (LYNXVALE LTD.), 18 October, 1990 (18.10.90), Especially, Claims 1, 2 & AU 9053509 A & EP 465539 A & JP 4-504357 A	1-5, 7, 11-16, 18, 22-24
Y	Mathew E. et al., The extracellular domain of vaccinia virus protein B5R affects plaque phenotype, extracellular enveloped virus release, and intracellular actin tail formation., J.Virol., 1998, Vol.72, No.3, p. 2429-38	1-5, 7, 11-16, 18, 22-24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
02 March, 2004 (02.03.04)

Date of mailing of the international search report  
16 March, 2004 (16.03.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/15632

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Herrera E. et al., Functional analysis of vaccinia virus B5R protein: essential role in virus envelopment is independent of a large protein of the extracellular domain., J.Virol., 1998, Vol.72, No.1, pages 294 to 302	1-5,7,11-16, 18,22-24
Y	Wolffe EJ. et al., Deletion of the vaccinia virus B5R gene encoding a 42-kilodalton membrane glyco protein inhibits extracellular virus envelope formation and dissemination., J.Virol., 1993 Vol.67, No.8, p.4732-41	1-5,7,11-16, 18,22-24
Y	Mathew EC. et al., A mutational analysis of the vaccinia virus B5R protein., J.Gen.Virol., 2001, Vol.82, Pt 5., p.1199-213	1-24
Y	Lorenzo MM. et al., Functional analysis of vaccinia virus B5R protein: role of the cytoplasmic tail., Virology., 1998, Vol.252, No.2, p.450-7	1-24



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int Cl<sup>1</sup> C12N7/01, C12N15/863, A61K39/285

B. 調査を行った分野  
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	杉本正信他, 国産天然痘ワクチンの新たな役割, 蛋白質 核酸 酵素, 9月, 2003, Vol. 48, No. 12, p. 1693-1701	1-24
Y	WO 90/12101 A (LYNXVALE LTD) 1990.10.18, especially claim 1, 2 &AU 9053509 A &EP 465539 A &JP 4-504357 A	1-5, 7, 11-16, 18, 22-24
Y	Mathew E et al, The extracellular domain of vaccinia virus protein B5R affects plaque phenotype, extracellular enveloped virus release, and intracellular actin tail formation., J Virol., 1998, Vol. 72, No. 3, p. 2429-38	1-5, 7, 11-16, 18, 22-24

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 02.03.2004

国際調査報告の発送日 16.3.2004

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
六笠 紀子

4 B 9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Herrera E et al, Functional analysis of vaccinia virus B5R protein: essential role in virus envelopment is independent of a large portion of the extracellular domain., J Virol., 1998, Vol. 72, No. 1, p. 294-302	1-5, 7, 11-16, 18, 22-24
Y	Wolffe EJ et al, Deletion of the vaccinia virus B5R gene encoding a 42-kilodalton membrane glycoprotein inhibits extracellular virus envelope formation and dissemination., J Virol., 1993, Vol. 67, No. 8, p. 4732-41	1-5, 7, 11-16, 18, 22-24
Y	Mathew EC et al, A mutational analysis of the vaccinia virus B5R protein., J Gen Virol., 2001, Vol. 82, Pt 5., p. 1199-213	1-24
Y	Lorenzo MM et al, Functional analysis of vaccinia virus B5R protein: role of the cytoplasmic tail., Virology., 1998, Vol. 252, No. 2, p. 450-7	1-24